

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Pesquisa de anticorpos anti-HLA em dadoras de sangue do
Centro Regional de Sangue Lisboa como medida preventiva de
*TRALI***

CARLA ISABEL DE JESUS NETO RODRIGUES

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Pesquisa de anticorpos anti-HLA em dadoras de sangue do
Centro Regional de Sangue Lisboa como medida preventiva de
*TRALI***

CARLA ISABEL DE JESUS NETO RODRIGUES

Dissertação para obtenção do grau de Mestre orientada por

Doutora Conceição Malcata, Centro Regional de Sangue de Lisboa, IPS,IP

Professora Doutora Deodália Dias, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2011

AGRADECIMENTOS:

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que tornaram a escrita desta tese possível, em especial:

À Dr^a Conceição Malcata, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação prestada em todas as fases e pela disponibilidade prestada, mesmo fora da sua hora de trabalho, na leitura dos rascunhos da minha tese e por tecer comentários sobre eles.

À Professora Doutora Deodália Dias por ter aceite orientar me neste projecto, pela disponibilidade dispensada ao longo deste ano. Pela atenção prestada sempre que me surgia qualquer dúvida.

À Sara Narciso e Bruno Marques pela ajuda indispensável que ofereceram para a realização da análise estatística dos dados.,

Aos meus colegas de trabalho pelo apoio psicológico e por me aturarem durante este longo processo.

À Ex-Directora do Centro Regional de Sangue de Lisboa, Dr^a Laura Castro por ter autorizado a realização desta tese no meu local de trabalho.

Por último à minha família, em especial ao meu marido, ao meu filho e aos meus pais pelo apoio incondicional, interesse, dedicação e carinho mesmo quando não tinha tempo para estar com eles.

Um bem haja a todos.

RESUMO:

TRALI é uma reacção transfusional grave associada à transfusão de componentes sanguíneos. É caracterizado por insuficiência respiratória aguda, edema pulmonar bilateral e hipoxia severa, sem comprometimento cardíaco, ocorrendo durante ou dentro das 6 horas, após a transfusão de um ou mais componentes sanguíneos. Foi demonstrado que uma parte dos casos de TRALI é devida a anticorpos contra antígenos de neutrófilos humanos (HNA) ou contra antígenos de leucócitos humanos (HLA) de classe I e de classe II. Os anticorpos anti-HLA no dador são formados pela exposição a células ou tecidos de outro ser humano (alo-exposição). Esta alo-exposição pode ser provocada por gravidez, transfusão de componentes sanguíneos ou transplante de stem cells, tecidos ou órgãos. Contudo nem sempre a alo exposição termina com a formação de anticorpos (alo-imunização).

Partindo do pressuposto que todos os dadores que tenham sido transfundidos são eliminados da dádiva só nos resta a aloexposição por gravidez. Assim a pesquisa de anticorpos anti-HLA classe I e classe II foram realizadas a um grupo de dadores de sangue, do sexo feminino com história prévia de gravidez, do Centro Regional de sangue de Lisboa. Das 400 dadoras estudadas podemos concluir que cerca de 12% apresentam HLA classe I, 12% apresenta HLA classe II e 3% apresentam HLA classe I e classe II. O total de aloimunizações neste grupo de estudo ronda os 21%.

A frequência de anticorpos anti-HLA classe II para o caso de dadoras com três ou mais gestações é bastante maior comparada com o caso de dadoras com uma ou duas gestações, embora possamos concluir que no caso das dadoras em que as gestações levaram a aborto, pelo reduzido tempo de exposição não levou à imunização induzida por anticorpos anti-HLA.

Como conclusão podemos aplicar as medidas, implementadas por outros países, para redução dos casos de TRALI que passa por reduzir o uso de PFC das dadoras do sexo feminino, dar preferência aos dadores do sexo masculino no caso de colheita de componentes sanguíneos por aférese e a pesquisa de anticorpos anti-HLA a todas as dadoras de primeira vez e sempre que sejam aloexpostas.

Palavras Chave: Alo-exposição, alo-imunização, anticorpos anti-HLA, gravidez, TRALI.

ABSTRACT:

Serious reaction transfusion associated with blood components transfusion (TRALI) is characterized by acute respiratory failure, bilateral pulmonary edema and severe hypoxia, without cardiac involvement, and occurs during or within 6 hours after transfusion of one or more blood components. It is demonstrated that part of TRALI cases is due to antibodies against either human neutrophils antigens (HNA) or human leukocyte antigen (HLA) class I and class II.

Anti-HLA antibodies in the donor are formed by exposure to tissues and cells from another human being (allo-exposure). This allo-exposure may be caused by pregnancy, transfusion of blood components or transplant of stem cells, tissues or organs. However not always allo-exposure ends with antibodies formation (allo-immunization). On the assumption that all donors have been transfused are eliminated to the donation, only allo-exposure by pregnancy is important to study.

The detection of leukocyte antibodies (anti-HLA) class I and class II in blood donors with history of pregnancy was determined in the Lisbon Regional Blood Center.

A total of 400 female donors were tested. HLA allo-immunization was observed about 12% of these donors presented HLA class I, 12% class II and 3% HLA classe I and II. Leucocyte antibody prevalence in the total of female donors was about 21%.

We observed that HLA antibodies prevalence is clearly related to the number of previous pregnancies. Prevalence of HLA alloimmunization increases with the parity and in the case of women with only aborted pregnancies the reduced exposure time did not lead to immunization-induced by antibodies HLA.

In conclusion, we have described that preventive measures, such as transfusion of plasma-rich blood components from male donors or questioning female donors about a history of pregnancy and testing those at risk of sensitization for HLA antibodies or preferentially recruited male apheresis donors, are effective in the reduction of severe and fatal TRALI.

Key words: allo-exposure, allo-immunization, leukocyte antibodies, pregnancy, TRALI.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

Ag	Antigénio
ALI	Lesão Pulmonar Aguda
APC	Antigénios apresentadores de células
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	Teste imunoenzimático, do inglês <i>Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HLA	Antigénio Leucocitário Humano
HNA	Antigénio de Neutrófilo Humano
IgG	Imunoglobulina G
MHC	Complexo principal de Histocompatibilidade, do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>
PFC	Plasma Fresco Congelado
PNPP	p-nitrofenil fosfato
RE	Reticulo Endoplasmático
TCR	Receptor da célula T
TNF	Factores de necrose tumoral

TRALI	Lesão Pulmonar Aguda associada à Transfusão, do inglês <i>Transfusion related acute lung injury</i>
-------	---

β^2m	beta 2 microglobulina
------------	-----------------------

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1	Mapa do MHC	3
Figura 2	Diagrama esquemático das moléculas de HLA classe I e II.	5
Figura 3	Imunopatologia do TRALI.	8
Figura 4	Aloreconhecimento	9
Figura 5	Classificação do TRALI.	11
Figura 6	Esquema Ilustrativo do Ensaio Imunoenzimático ELISA	17
Figura 7	Total da prevalência em anticorpos anti-HLA classe I e em anticorpos anti-HLA classe II	20
Figura 8	Total da prevalência em anticorpos anti-HLA classe I ou classe II.	21
Figura 9	Total da prevalência de anticorpos anti-HLA classe I e classe II.	22
Figura 10	Relação das prevalências imunizações anti-HLA classe I e classe II com o nº de gestações	23
Figura 11	Prevalência da existência de anticorpos anti-HLA classe I e II em relação ao Resultado da Gestação	24
Figura 12	Representação Gráfica das prevalências dos anticorpos anti-HLA classe I e II pelos grupos 1G ou 2G e 3G ou 4G.	26

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1	Total de Anticorpos anti-HLA classe I e classe II positivos e respectiva prevalência nos dadores de sangue do sexo feminino do Centro Regional de Sangue de Lisboa.	20
Tabela 2	Relaciona o número de resultados positivos de anticorpos anti-HLA com o número de gestações	22
Tabela 3	Relacionamento dos anticorpos com os resultados das gestações	23
Tabela 4	Disposição do resultado da gestação de todas as mulheres dadoras do CRSL utilizadas no estudo.	24
Tabela 5	Total de anticorpos anti-HLA positivos entre grupos de 1 ou 2 gestações e entre 3 ou 4 gestações.	25
Tabela 6	Prevalências dos anticorpos anti-HLA classe I e II entre os grupos de 1G ou 2 G e 3G ou 4G.	25
Tabela 7	Comparação da Frequência de anticorpos anti-HLA positivos nos dadores do sexo feminino multiparas da Alemanha com o Reino Unido em conjunto com o nosso estudo.	32
Tabela 8	Casos de Lesão Pulmonar Aguda produzida por Transfusão (TRALI) publicados pela Rede de Hemovigilância em Portugal.	32
Tabela 9	Casos de Lesão Pulmonar Aguda produzida por Transfusão (TRALI) publicados pelas Redes de Hemovigilância.	33
Tabela 10	Casos de TRALI com presença de anticorpos anti-HLA	33

Índice Geral

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO	ii
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
I. INTRODUÇÃO	1
1. Sistema HLA	2
1.1 Organização Genómica do MHC humano	2
1.2 Recombinação Genética.....	3
1.3 Expressão Tecidual das moléculas de HLA.....	3
1.4 Estrutura e polimorfismos das moléculas de HLA.....	4
2. TRALI.....	5
2.1 Caracterização Clínica	5
2.2 Epidemiologia	6
2.3 Fisiopatologia.....	7
3. O sistema HLA na Transusão de Componentes Sanguíneos	9
3.1 Mecanismos de Alorreconhecimento	9
3.2 Relação do Sistema HLA com a TRALI.....	10
II. OBJECTIVOS	12
III. MATERIAL E MÉTODOS	14
1. População Estudada	15
2. Procedimentos Laboratoriais	15
2.1 Obtenção das Amostras	15
2.2 Metodologias utilizadas	15
3. Tratamento Estatístico	17
IV. RESULTADOS	19
1. Frequência dos Anticorpos anti-HLA classe I e II positivas nas dadoras do CRSL	20
2. Relação da Aloimunização HLA com o número de Gestações	22
2.1 Frequência por número de gestações em relação às aloimunizações anti-HLA	22

2.2 Comparação da frequência entre os grupos com 1 ou 2 gestações e com 3 ou 4 gestações	25
V. DISCUSSÃO.....	28
1.A importância da pesquisa de anticorpos anti-HLA classe I e II no serviço de Imunohemoterapia	30
2. Hemovigilância	32
3. Prevenção	34
VI. CONCLUSÃO	35
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
VIII. ANEXO I	41

I.INTRODUÇÃO



No homem, o sistema HLA (*Human Leucocyte Antigen*) é o mais polimórfico de todos os sistemas antigénicos sendo de grande interesse o seu estudo relacionado com a medicina transfusional. Pode ocorrer alossensibilização anti-HLA sempre que existe contacto de moléculas deste sistema, com o sistema imunitário de indivíduos geneticamente diferentes. Esta alossensibilização pode ocorrer por transfusão de sangue, por gravidez ou por transplantação¹.

TRALI (*Transfusion related acute lung injury*) ou Lesão Pulmonar Aguda associada à transfusão está frequentemente relacionado com anticorpos anti-HLA e é actualmente considerado uma das principais causas de morte nos Estados Unidos e Reino Unido. Todos os componentes sanguíneos que possuem plasma podem levar a esta reacção transfusional².

1- O sistema HLA:

O sistema HLA foi descoberto na década de 50 por *Dausset, Payne e Van Rood*, que detectou no soro de doentes politransfundidos e de mulheres múltiparas, anticorpos que reagem com os leucócitos por aglutinação³.

O MHC humano é chamado sistema HLA (antigénio leucocitário humano). O sistema HLA é bem conhecido como antigénio de transplantação, mas o papel principal biológico das moléculas HLA é a regulação da resposta imune³.

1.1 - Organização Genómica do MHC humano:

O mapa MHC humano situa-se no braço curto do cromossoma 6 (6p21) e compreende aproximadamente 3600 kilobases de DNA. O MHC humano pode ser dividido em 3 regiões:

A região da classe I é localizada no fim do telómero do complexo, a região de classe II no fim do centrómero e a região da classe III no centro.

A região de classe I consiste nos genes clássicos (HLA-A, HLA-B, HLA-C), os genes não clássicos (HLA-E, HLA-F, HLA-G), pseudogenes (HLA-H, HLA-J, HLA-K, HLA-L) e os genes fragmentos (HLA-N, HLA-S, HLA-X).

Os locus de HLA-A, HLA-B, HLA-C codificam as cadeias pesadas α dos antigénios de classe I. alguns dos genes de classe I não clássicos são expressos com polimorfismos limitados e as suas funções ainda não são bem conhecidas.

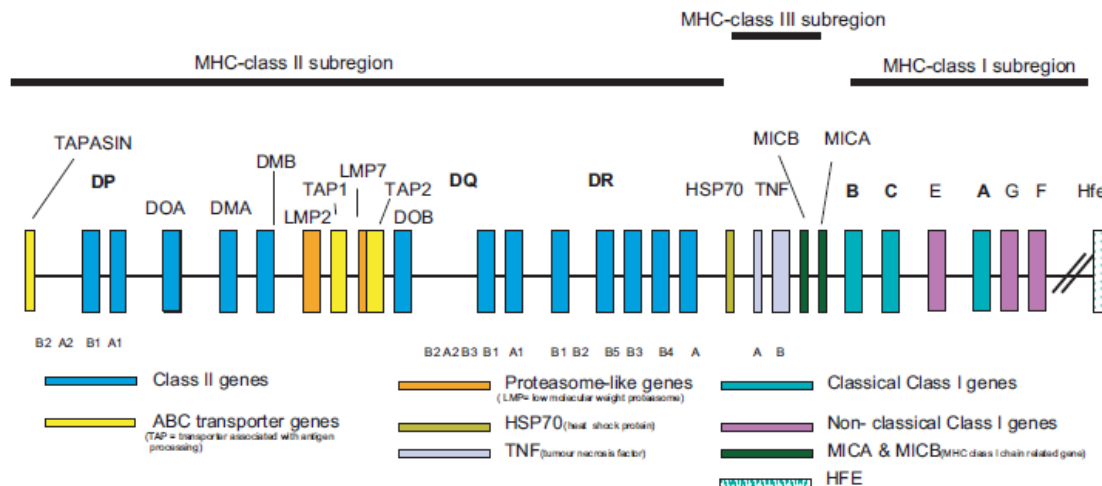


Figura.1 – Mapa do MHC⁷.

A região da classe II consiste numa série de subregiões que contêm genes A e B que codificam cadeias α e β respectivamente. As subregiões DR, DQ e DP codificam os produtos expressos na região de classe II.

A região de classe III não codifica moléculas HLA, mas contêm genes para os componentes do complemento (C2, C4, Factor B), 21-hidroxilase e factores de necrose tumoral (TNF)³.

1.2 – Recombinação Genética:

O sistema MHC é herdado num sistema Mendeliano, em que existe herança de um haplótipo materno e paterno em co-dominância. Recombinação genética no sistema HLA ocorre com uma frequência menor que 1% e ocorre mais frequentemente entre os locus DQ e DP. A segregação de haplótipos com a família pode ser assinalada com um estudo à família. Dois irmãos têm 25% de hipótese de serem genotipicamente HLA idênticos, têm 50% de hipótese de serem haploidênticos em HLA (partilham um haplótipo) e 25% de hipótese de não partilharem nenhum haplótipo HLA³.

As possíveis combinações de antígenos de diferentes loci HLA num haplótipo HLA são enormes, mas alguns haplótipos HLA são encontrados com mais frequência do que o esperado por acaso em determinadas populações. Este fenómeno é chamado de *desequilíbrio de linkage*³.

1.3 - Expressão Tecidual das moléculas de HLA:

As moléculas HLA de classe I são expressas na superfície de quase todas as células nucleadas. Elas também podem ser encontradas nos eritrócitos e plaquetas. As

moléculas HLA de classe I presentes na superfície da plaqueta provavelmente derivam de megacariócitos e também de adsorção de antígenos solúveis no plasma³.

As moléculas HLA de classe II são expressas de uma maneira constitutiva, pelas células apresentadoras de antígenos ou APC nomeadamente em linfócitos B, monócitos, macrófagos e células dendríticas⁴.

Um segundo nível de regulação da expressão de moléculas de MHC é o que ocorre no retículo endoplasmático (RE), no caso de moléculas de HLA classe I e no RE e nos lisossomas no caso de moléculas de HLA classe II⁴.

1.4 - Estrutura e polimorfismo das moléculas de HLA:

As moléculas HLA de classe I são compostas por duas cadeias polipeptídicas, uma cadeia pesada α transmembranar de 44 a 49 KDa com três domínios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) e uma cadeia leve de 12 KDa designada $\beta 2$ microglobulina e um péptido de entre 8 a 11 aminoácidos⁴.

A cadeia α tem 4 regiões: uma região citoplasmática contendo sítios de fosforilação e de ligação a elementos do citoesqueleto, uma região transmembranar contendo aminoácidos hidrofóbicos pelos quais a molécula é fixa à membrana celular, um domínio conservado tipo imunoglobulina $\alpha 3$ ao qual se liga o CD8 e por fim uma região de ligação a péptidos, com sequências de aminoácidos variáveis formada pelos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$. Devido à variabilidade dos aminoácidos nesta região, diferentes moléculas de HLA classe I ligam e expõem diferentes péptidos sendo especificamente reconhecidos pelos receptores das células T CD8+. Os domínios $\alpha 3$ e $\beta 2m$ formam a imunoglobulina constante, e ajuda a manter a conformação apropriada da molécula⁴.

As moléculas de HLA classe II são estruturas triméricas associadas de um modo não covalente e são compostas por duas cadeias polipeptídicas pesadas transmembranares uma α com dois domínios extracelulares ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) e uma β com dois domínios extracelulares ($\beta 1$ e $\beta 2$) e um péptido de 12 a 30 aminoácidos. Ambas as cadeias têm quatro regiões. A primeira é uma região citoplasmática contendo regiões de fosforilação e elementos de ligação ao citoesqueleto, a segunda é uma região transmembranar contendo aminoácidos hidrofóbicos pelos quais a molécula se liga à membrana celular, a terceira é uma região com um domínio $\alpha 2$ e um domínio $\beta 2$ onde se vai ligar o CD4 e uma quarta região de ligação a péptidos altamente polimórfica

formada pelos domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$. Estas moléculas são especificamente reconhecidas pelos receptores das células T CD4⁺.

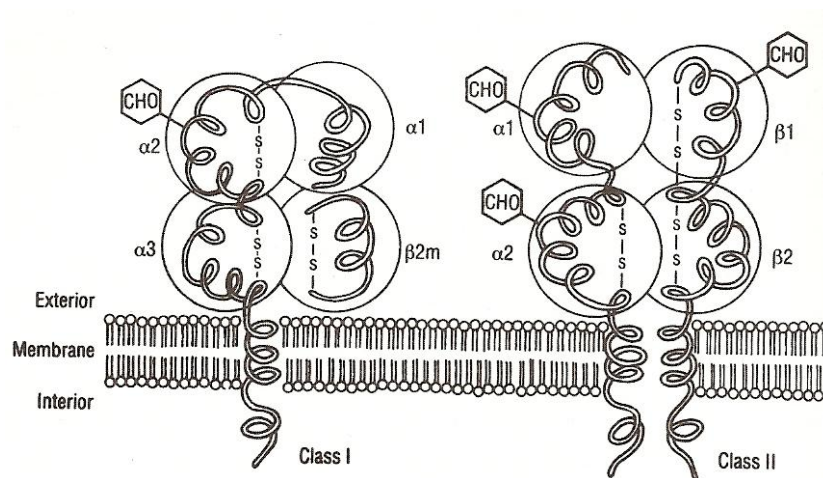


Figura 2- Diagrama esquemático das moléculas de HLA classe I e II. A molécula de classe I consiste numa cadeia pesada e uma cadeia leve β_2 -microglobulina. A molécula de classe II é um heterodímero que consiste em cadeias α e β . As cadeias disulfeto estão assinaladas por -S-S-^{3,10}.

2 - TRALI

A lesão pulmonar aguda associada à transfusão (Transfusion related acute lung injury, TRALI) foi reconhecida como entidade clínica em 1983. A TRALI é considerada uma reacção transfusional grave associada à transfusão de componentes sanguíneos que contém plasma⁵.

A maioria dos dadores implicados no caso da TRALI são mulheres múltiparas. A TRALI para além de ser pouco diagnosticada pode ainda ser confundida com outras situações de insuficiência respiratória aguda, embora se esta reacção for melhor compreendida pode ser crucial na prevenção e tratamento desta complicação transfusional grave⁵.

2.1 - Caracterização clínica:

A TRALI é caracterizada por insuficiência respiratória aguda, edema pulmonar bilateral e hipoxia severa com pressão parcial de oxigénio no sangue arterial/fracção inspirada de oxigénio < 300 mmHg, ocorrendo durante ou dentro das 6 horas, após a transfusão⁶.

O edema pulmonar bilateral pode ser acompanhado nas primeiras horas por exames radiológicos, com progressão do infiltrado alveolar e intersticial sem comprometimento cardiogénico⁶.

A resolução da TRALI ocorre na maioria dos doentes dentro de 48 horas, com exames radiológicos normais em 4 dias^{5,6}. No entanto, a hipoxia e o edema pulmonar podem persistir acima de 7 dias⁵.

Hoje em dia a maioria dos casos da TRALI envolve o uso de sangue total, plasma fresco congelado, concentrado de eritrócitos e concentrado de plaquetas por aférese⁵.

Nos casos mais leves de TRALI basta um suporte de oxigénio mas nos casos mais graves é necessário a ventilação mecânica. A eficácia do uso de corticosteróides ou de diuréticos continua envolta em controvérsias⁶. No entanto, e apesar do conhecimento desta reacção transfusional, a mortalidade a ela associada ainda ocorre de 6 a 20%⁶.

Em 2004, a conferência de consenso organizado pelo *Canadian Blood Service e Hema-Quebec* (Canadá) estabeleceram os critérios da definição canadense que é muito similar aos da conferência de consenso de *North American European*, introduzem a diferença entre TRALI e “possível” TRALI². Tanto uma como outra tem limitações:

1. Só identificam novos casos e graves de hipoxémia. As formas leves de TRALI podem passar despercebidas.
2. O diagnóstico de TRALI em pacientes com outros factores de risco de ALI requerem uma valorização mais elaborada e mesmo assim existem casos indeterminados.
3. A definição não inclui provas de laboratório pelo que o diagnóstico é exclusivamente clínico.
4. O limite de 6 horas pode não detectar casos que se desenrolam mais tarde².

Para que se não haja discrepâncias nas notificações do Sistema de Hemovigilância, foram definidas as características para que todos reportem os casos de TRALI:

O aparecimento de insuficiência respiratória durante ou dentro das 6 horas, após a transfusão; a ausência de sinais de sobrecarga circulatória; o exame radiológico com aparecimento de edema pulmonar bilateral; hipoxémia e ausência de outros factores de risco para Lesão Pulmonar Aguda (ALI)⁷.

Recentemente, *Marik e Corwin* propuseram uma amplificação da definição da TRALI em função do período de começo e quadro clínico: TRALI clássico, que começa durante as primeiras 6 horas após a transfusão e que coincide com o modelo de TRALI imune e TRALI tardio ou não imune, que começa entre as 6 até as 72 horas da transfusão e cujo mecanismo de produção seria por mediadores⁸.

2.2 - Epidemiologia:

Barnard, em 1951, relata reacção de hipersensibilidade com características que podem sugerir a TRALI. TRALI como entidade clínica foi inicialmente reconhecido por *Popovsky et al*, em 1983 e volta a ser novamente referenciada por *Popovsky e Moore* em 1985. Desde então, emerge como uma das complicações mais graves da transfusão de sangue^{6,19}.

A incidência da TRALI tem variado de acordo com definições de caso e métodos de vigilância e recolha de dados sobre componentes sanguíneos transfundidos. Na maior parte da literatura encontrada refere-se a um caso para cada 1.200 transfusões em estudos observacionais a um por 500 mil transfusões em sistemas de vigilância passiva. Esta última taxa é considerada uma estimativa por baixo, porque a maioria dos casos não são reconhecidos nem relatadas⁸.

Por exemplo, *Kopko et al* fez uma revisão retrospectiva de 36 prontuários de pacientes sobre a recomendação de *Food and Drug Administration EUA (FDA)* numa investigação de “look-back” sobre as transfusões que levaram a reacções transfusionais. Dos 36 pacientes que foram transfundidos com plasma fresco congelado (PFC) de um dador específico (de 54 anos de idade, do sexo feminino múltiparas), 13 (36%) apresentaram reacções transfusionais⁸.

Das oito reacções graves envolvendo ALI, a TRALI foi referenciada no diagnóstico diferencial de apenas dois. É razoável suspeitar que todos os oito pacientes tinham TRALI. Até recentemente, não havia uma definição uniforme de TRALI⁸.

2.3 - Fisiopatologia:

A reacção imunológica será proveniente dos componentes sanguíneos com plasma principalmente de mulheres múltiparas, que são frequentemente imunizadas contra antígenos leucocitários durante a gravidez. Esta reacção passa por uma ligação de anticorpos provenientes do dador contra os antígenos leucocitários do receptor (doente)⁵ enquanto a reacção não imunológica passa por activação de granulócitos

mediado por substâncias lipídicas solúveis provenientes da degradação celular acumulada durante o armazenamento dos componentes sanguíneos⁹.

Através de um modelo experimental, descobriu-se que as reacções da TRALI são iniciadas pela activação de granulócitos por transfusão de anticorpos e/ou lipídios biologicamente activos e que esta activação induz a libertação de anafilotoxinas, citocinas e quimiocinas que promove a quimiotaxia de neutrófilos e agregação no pulmão. O resultado desta reacção leva a destruição endotelial, aumenta a permeabilidade vascular do pulmão e passagem de líquido para os alvéolos originando edema pulmonar não cardiogénico. Como resultado desta experiência, foi postulado dois mecanismos para explicar o desenvolvimento da TRALI. Por um lado a reacção mediada por anticorpos, por outro, um mediador solúvel. Ambos os mecanismos envolvem a activação de granulócitos e o desencadeamento do processo inflamatório que leva ao sequestro de neutrófilos no pulmão⁹.

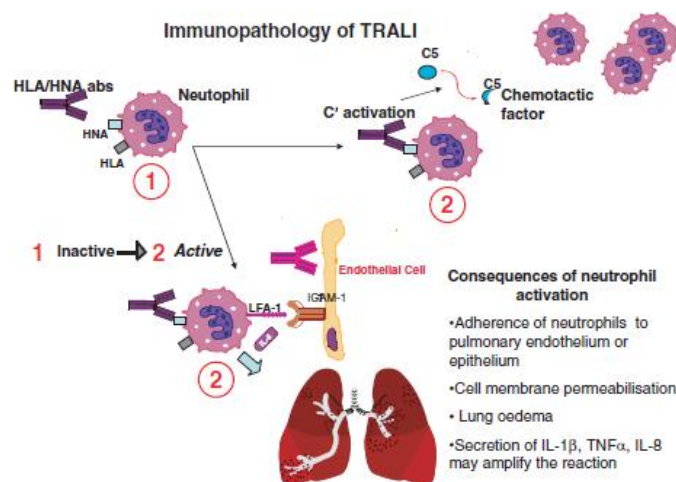


Figura 3 - Immunopatologia do TRALI⁹

Depois de vários estudos realizados onde se demonstra que componentes sanguíneos provenientes do mesmo dador num doente leva ao desencadeamento da reacção transfusional (TRALI) e noutro doente não têm qualquer reacção. Levou a postular que a condição clínica do doente também pode ser um factor para o desencadeamento da TRALI para além dos anticorpos e dos mediadores solúveis^{1,9}.

3 - O sistema HLA na Transfusão de Componentes Sanguíneos:

Os anticorpos anti-HLA podem ser formados após a exposição a proteínas estranhas HLA. As três formas de exposição a aloantígenos HLA são a gravidez, transfusão e transplante.

A fonte mais comum de anticorpos anti-HLA em dadores de sangue saudáveis é a gravidez. Um estudo recente de componentes sanguíneos demonstrou a presença de anticorpos anti-HLA de classe II, ou ambos, em 22% dos componentes testados. Se cerca de um quinto dos componentes sanguíneos contém anticorpos anti-HLA, e se a presença somente de anticorpos forem suficientes para manifestar a TRALI, o transtorno seria muito mais comum do que actualmente observamos¹⁰.

A transfusão ou transplante de células ou tecidos expressam moléculas de superfície celular que diferem das presentes no receptor resultando assim no seu reconhecimento e posterior desenvolvimento de uma forte resposta humoral e celular. Os antígenos do sistema HLA são particularmente eficientes em provocar respostas imunes, pois podem ser reconhecidas indirectamente ou directamente pelas células do sistema imunitário⁹.

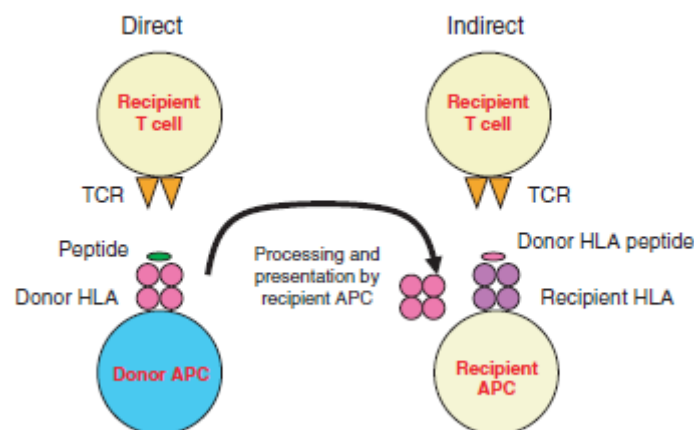


Figura 4 – Alorreconhecimento⁹

3.1 – Mecanismos de Alorreconhecimento:

A via directa envolve o reconhecimento directo das moléculas HLA do dador, expressas pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), no sangue ou no transplante esta vai activar a população de células T aloreactivas. Esta via parece ser a forma mais imediata

de indução da rejeição por um processo inflamatório mediado pelas células T. Esta via está extremamente ligada à rejeição aguda celular⁹.

A via indirecta segue a mesma via até ao reconhecimento do antígeno mas neste caso envolve o processamento e apresentação dos péptidos derivados do dador HLA pela APC do hospedeiro. Esta via funciona de forma mais eficiente em indivíduos previamente sensibilizados transportando células T de memória que pode rapidamente responder ao desafio antigénico⁹. As células CD4 são importantes mediadores deste processo contribuindo, para além de outras funções, na produção de anticorpos¹¹.

Em termos da transfusão de sangue, a implementação dos filtros de leucoredução em todos os componentes sanguíneos diminui a frequência de doentes alosensibilizados. No entanto ainda se encontra doentes que depois da transfusão apresentam aloanticorpos anti-leucocitários detectados pelas técnicas convencionais. Embora esteja provado que através da transfusão de sangue a via de alorreconhecimento activa é a indirecta¹¹.

Descoberta recentemente surge uma terceira via, que é a via de alorreconhecimento semi-directo. Esta via é baseada nas células dendríticas do receptor ao contactarem com as células do dador, dendríticas, macrófagos, linfócitos B ou T activados, expressam moléculas HLA deste. Estas moléculas HLA intactas são adquiridas pelo receptor que passam a mostrar na sua membrana as moléculas HLA do dador. Essas moléculas de HLA mantêm a capacidade de estimular as células T¹¹.

3.2 – Relação do Sistema HLA com a TRALI:

Há um crescente reconhecimento de que os anticorpos não são suficientes para provocar TRALI, que a etiologia da TRALI é complexa e que os anticorpos anti-HLA representam um factor importante na fisiopatologia da TRALI. Para provar que os anticorpos HLA podem levar ao aparecimento da TRALI nalguns pacientes, era necessário realizar um estudo controlado sobre os resultados dos pacientes que recebem componentes sanguíneos com anticorpos anti- HLA que correspondem às suas proteínas HLA⁹.

Existem estudos disponíveis, em que evidenciam uma associação de anticorpos anti-HLA com TRALI e uma clara associação da TRALI com plasma de dadores do

sexo feminino, o Reino Unido Serviço Nacional de Sangue implementou uma estratégia no final de 2003 para tentar reduzir a incidência da TRALI.⁴

Estudos realizados em modelos animais demonstram que as reacções de TRALI são iniciadas com a activação de granulócitos transfundidos por anticorpos e/ou biologicamente lipídios activos e que esta activação induz a libertação de anafilatoxinas, citocinas e quimiocinas que promovem a quimiotaxia de neutrófilos e agregação nos pulmões. A reacção resultante causa dano endotelial e aumento da permeabilidade vascular pulmonar e vazamento de fluidos para dentro dos alvéolos causando edema pulmonar não cardiogénico⁹. Tal como referido anteriormente existem inúmeros factores que podem potenciar esta reacção, que podem incluir as características do anticorpo, a natureza e distribuição do antigénio relacionado, a extensão da activação do complemento e por fim o estado imunológico do paciente. Dados interessantes, recentemente publicados obtidos de um modelo animal demonstram que as células T do destinatário são necessárias para modular a gravidade da reacção de TRALI mediada por anticorpos⁷.

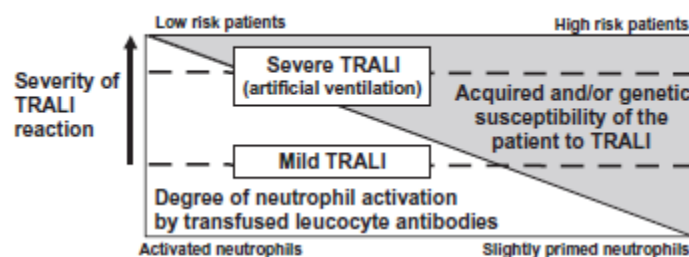


Figura 5: Classificação do TRALI.⁷

Podemos resumir a classificação de TRALI ou possível TRALI com esta figura que nos consilia a predisposição do paciente com a activação dos neutrófilos no caso dos componentes transfundidos possuírem anticorpos leucocitários.

A crescente evidência da importância da pesquisa de anticorpos anti-HLA classe I e II demonstrada pelos estudos noutros países, tal como as medidas de prevenção e redução da ocorrência desta reacção transfusional (TRALI) demonstra o interesse deste trabalho.

II. OBJETIVOS



Tendo o IPS, IP por missão regular, a nível nacional, as actividades da medicina transfusional e garantir a disponibilidade e acessibilidade de sangue e componentes sanguíneos de qualidade, torna-se necessário e interessante avaliar a pesquisa de anticorpos anti-HLA classe I e II nas dadoras de sangue desta instituição. Sendo o Centro Regional de Sangue de Lisboa o fornecedor de componentes sanguíneos com elevados níveis de qualidade a nível nacional e como não há nenhum estudo nesta área, o presente trabalho constitui um estudo piloto sobre esta temática.

Assim o estudo proposto tem como principais objectivos:

- Determinar a frequência de anticorpos anti HLA positivos e a relação entre aloimunização HLA da classe I em relação à classe II ou ambas classe I e II.
- Relacionar a aloimunização com o número de gestações e o resultado das gestações.

III. MATERIAL E MÉTODOS



1 - POPULAÇÃO ESTUDADA:

A população envolvida neste estudo corresponde a um grupo de dadores do sexo feminino, tendo referência ao nº de gestações e nº de partos. Todas as que não tinham essa informação foram excluídas.

Os critérios de inclusão foram respeitados por 400 dadoras daí o estudo incidir sobre este número.

2 - PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS:

2.1 – OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS:

O sangue deve ser colhido em EDTA (plasma) ou sem anticoagulante (soro) usando técnicas de assépticas e deve ser testado enquanto fresco para minimizar a probabilidade de falsos positivos ou falsos negativos devido a armazenamento impróprio ou contaminações da amostra. As amostras que não possam ser testadas imediatamente devem ser armazenadas a 2-8°C por um máximo de 48 horas ou congeladas. As amostras congeladas a -20°C ou menos mantêm-se em boas condições durante vários anos (2-3 anos).

As amostras utilizadas são obtidas no acto da colheita a dadores do sexo feminino em tubos com EDTA daí termos feito as análises, primeiro com o plasma em duplicado. Sempre que os resultados deram positivos foram convocadas e na próxima dádiva foram retiradas as amostras no tubo sem anticoagulante e um com EDTA daí serem realizadas as análises em duplicado em soro e plasma.

As amostras contaminadas, hemolizadas, lipémicas e ictéricas não foram utilizadas por darem resultados inconsistentes.

2.2 - METODOLOGIAS UTILIZADAS:

As amostras foram submetidas à pesquisa de anticorpos anti-HLA classe I e classe II pelo método de ensaio imunoenzimático (ELISA) qualitativo de fase sólida para detectar a presença de anticorpos do tipo IgG (QuikScreen®, B-Screen® GTI Diagnostics).

2.2.1 Princípio do método para pesquisa de anticorpos anti-HLA classe I (QuikScreen ®):

O ELISA de fase sólida QuikScreen ® fornece glicoproteínas HLA classe I purificadas por afinidade, obtidas de plaquetas de dadores de sangue de raça brancos, negros e hispânicos. As glicoproteínas purificadas são imobilizadas em micropoços. O teste é concebido para detectar anticorpos para antígenos HLA classe I (HLA –A, -B, -C).

O soro ou plasma do paciente é adicionado aos micropoços revestidos com glicoproteínas HLA classe I purificados por afinidade permitindo que o anticorpo, se presente, se ligue. Os anticorpos não ligados são então lavados. Adiciona-se globulina anti-humana marcada com fosfatase alcalina (Anti-IgG) aos poços e incuba-se. O material anti-IgG não ligado é lavado e adiciona-se substrato PNPP (p-nitrofenil fosfato). Após o período de incubação de 30 minutos, a reacção é parada com uma solução de hidróxido de sódio. A densidade óptica da cor que se desenvolve é medida num espectrofotómetro a um comprimento de onda de 405 a 410 nm usando um filtro de referência de 490nm.

2.2.2 Princípio do método para pesquisa de anticorpos anti-HLA classe II (B-Screen ®):

O ELISA de fase sólida B-Screen ® fornece glicoproteínas HLA classe II purificadas por afinidade, obtidas de linhas celulares de linfócitos B transformados de EBV. Os linfócitos são cuidadosamente escolhidos para fornecer uma vasta gama de antígenos HLA de classe II.

O soro do paciente é adicionado aos micropoços revestidos com glicoproteínas HLA classe II purificados por afinidade permitindo que o anticorpo, se presente, se ligue. Os anticorpos não ligados são então lavados. Adiciona-se globulina anti-humana marcada com fosfatase alcalina (Anti-IgG) aos poços e incuba-se. O material anti-IgG não ligado é lavado e adiciona-se substrato PNPP (p-nitrofenil fosfato). Após o período de incubação de 30 minutos, a reacção é parada com uma solução de hidróxido de sódio. A densidade óptica da cor que se desenvolve é medida num espectrofotómetro a um comprimento de onda de 405 a 410 nm usando um filtro de referência de 490nm.

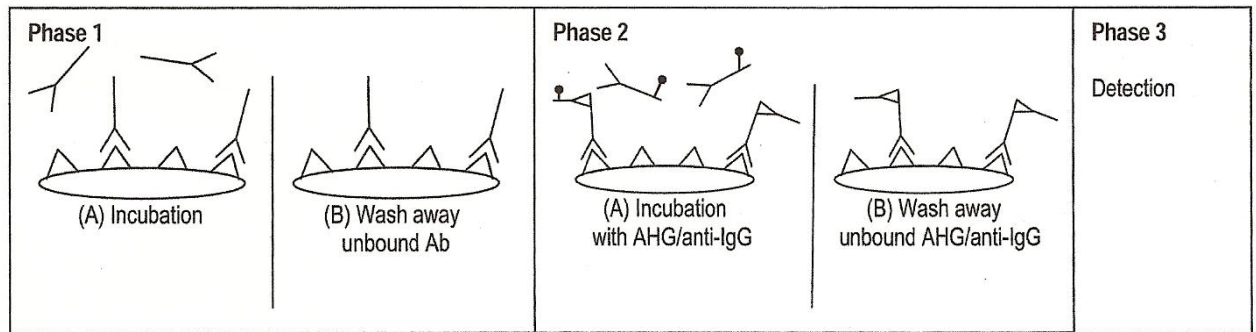


Figura 6 – Esquema Ilustrativo do Ensaio Imunoenzimático ELISA. ¹¹

Vantagens da utilização deste método:

Usamos um método de ELISA para detecção de anticorpos anti-HLA sendo um método altamente sensível e específico com alto grau de confiança como ensaio qualitativo e com custo baixo a médio. Utilizado inicialmente pelos serviços de transplante com muito bom sucesso podendo ser utilizado pelos serviços de sangue como análise de rotina. Para avaliação do TRALI ainda não há nenhum método específico. Esta avaliação é feita numa recolha dos produtos sanguíneos de um pós-TRALI a qual se procura os anticorpos anti-HLA no dador e no receptor. A baixa taxa de falsos positivos neste teste é preferível a uma similar ou mesmo superior taxa de falsos negativos.

3. TRATAMENTO ESTATÍSTICO:

Para o tratamento estatístico avalia-se a relação do número de gestações com a aloimunização das dadoras para os anticorpos anti-HLA classe I e II.

Para verificar se existe relação entre a aloimunização e o número de gestações utilizou-se o teste de independência do Qui-Quadrado. Este teste “mede” a diferença entre o número de casos observados e o número de casos esperados (em cada célula). Se esta diferença for significativa, as variáveis são dependentes, caso contrário, as variáveis não dependem uma da outra²².

Foi feita uma análise global de todos os resultados para avaliar a frequência da presença de anticorpos de anti-HLA classe I e da classe II. Foram colocados os resultados em folha de Excel com indicação dos resultados obtidos bem como do número de gestações e nº de partos para se proceder ao cálculo das frequências de HLA I, HLA II e ambas as imunizações classe I e II.

Para o cálculo das frequências dos anticorpos anti-HLA classe I e classe II foram agrupadas as mulheres com o mesmo número de gestações, independentemente do tempo decorrido desde a última gravidez. Apenas as mulheres com uma ou mais gestações foram utilizadas para esse cálculo (ou seja, o nº de gestações foi independente do tempo desde a última gravidez).

Para a análise das mudanças na frequência de anticorpos no tempo após a última gravidez, foi agrupada as mulheres com um ou duas gestações e comparadas às mulheres com três ou mais gestações, em ambas as classes de anticorpos anti-HLA. Também foi calculado a frequência de anticorpos anti-HLA classe I e II após partos única vida (Apenas nascimentos), apenas gestações abortadas (só aborto), e tanto partos com vida e gestações abortadas (nascimentos e abortos). A frequência destes anticorpos foi padronizada de acordo com a percentagem de mulheres com um determinado número de gestações no grupo total, independentemente do resultado da gravidez.

O tratamento estatístico foi efectuado com o programa SPSS (statistical Package for the Social Sciences) versão 17.0 (*SPSS Inc.Chicago*, USA) e com o apoio de Sara Narciso e de Bruno Silva Marques do Departamento de Estatística da Faculdade de Ciências de Lisboa.

IV. RESULTADOS

--

1. Frequência dos Anticorpos anti-HLA classe I e II positivos nas dadoras do CRSL:

Começámos por fazer a contagem de indivíduos Positivos e Negativos na pesquisa de anticorpos anti-HLA classe I, anti-HLA classe II, em ambos e em qualquer um dos casos. A frequência foi calculada como sendo o quociente entre o nº de positivos e o total de indivíduos da amostra para HLA I, HLA II, para ambos e para qualquer uma das classes.

	HLA classe I	HLA classe II	HLA classe I ou HLA classe II	HLA classe I e HLA classe II
Positivo	47	49	84	12
Negativo	353	351	316	388
Frequência	0,1175	0,1225	0,21	0,03

Tabela 1: Total de Anticorpos anti-HLA classe I e classe II positivos e respectiva frequência nos dadores de sangue do sexo feminino do Centro Regional de Sangue de Lisboa.

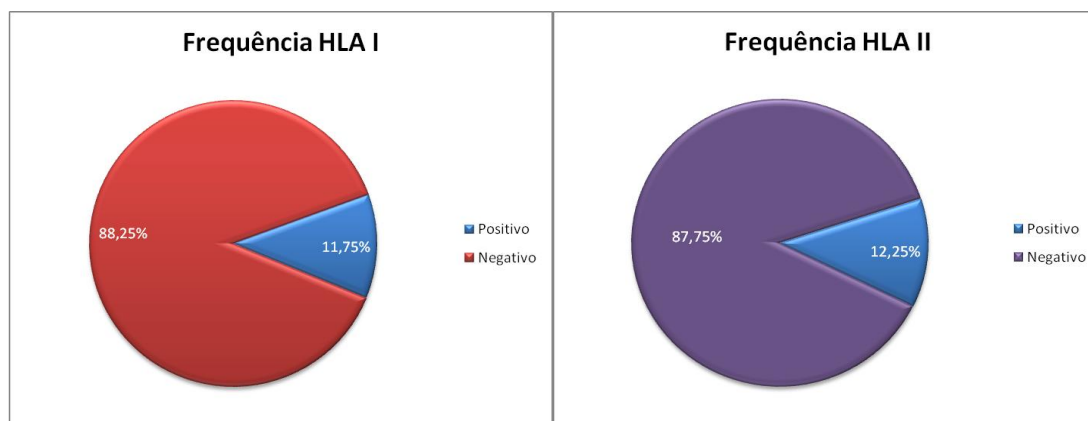


Figura 7 – Total de Frequência em anticorpos anti-HLA classe I e em anticorpos anti-HLA classe II.

Interpretação:

A frequência de anticorpos anti-HLA de classe I positivos num grupo de 400 dadoras de sangue do Centro Regional de Sangue de Lisboa é de 0,1175 e para os anticorpos anti-HLA classe II positivos é de 0,1225.

Pelo gráfico circular podemos verificar que 11,75% da população em estudo apresenta anticorpos anti-HLA classe I e 12,25% apresenta anticorpos anti-HLA classe II.

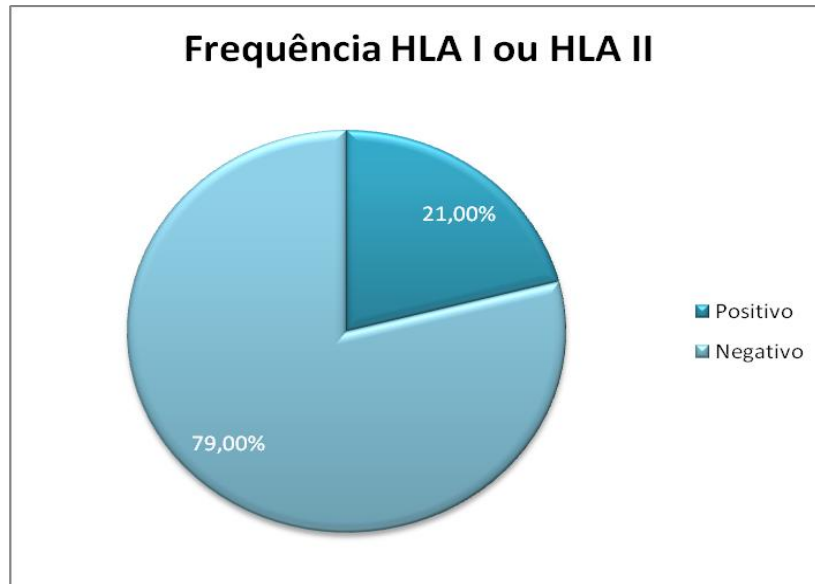


Figura 8 - Total da frequência em anticorpos anti-HLA classe I ou classe II.

Interpretação:

A frequência de anticorpos anti-HLA classe I ou classe II positivos num grupo de 400 dadoras de sangue do Centro Regional de Sangue de Lisboa são de 0,21.

Pelo gráfico circular podemos verificar que 21% da população em estudo apresenta anticorpos anti-HLA classe I ou classe II.

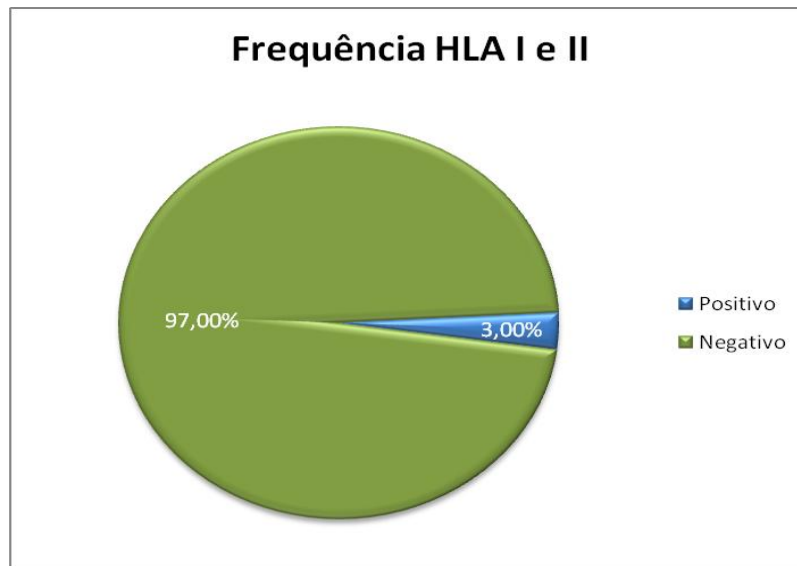


Figura 9 - Total da frequência de anticorpos anti-HLA classe I e classe II.

Interpretação:

A frequência de anticorpos anti-HLA classe I e II positivos num grupo de 400 dadoras de sangue do Centro Regional de Sangue de Lisboa é de 0,03.

Pelo gráfico circular podemos verificar que 3% da população em estudo apresenta anticorpos anti-HLA classe I e II.

Podemos ainda verificar que existem mais casos positivos em anticorpos anti-HLA de classe II (49) do que em anticorpos anti-HLA de classe I (47). Porém, esta diferença é mínima. Por outro lado, existe uma diferença considerável no nº de casos positivos em ambas as classes de HLA (apenas 12) e 84 casos positivos em qualquer uma das classes de HLA em 400 mulheres.

2. Relação da Aloimunização HLA com o número de Gestações:

2.1 Frequência por número de gestações em relação às aloimunizações anti-HLA Classe I e Classe II:

Gestações	1	2	3	4	>4
Frequência por nº de gestações HLA Classe I	0,076	0,138	0,125	0,136	0,176
Frequência por nº de gestações HLA Classe II	0,038	0,144	0,214	0,182	0,176

Tabela 2: Relaciona o nº de resultados positivos de anticorpos anti-HLA com o número de gestações

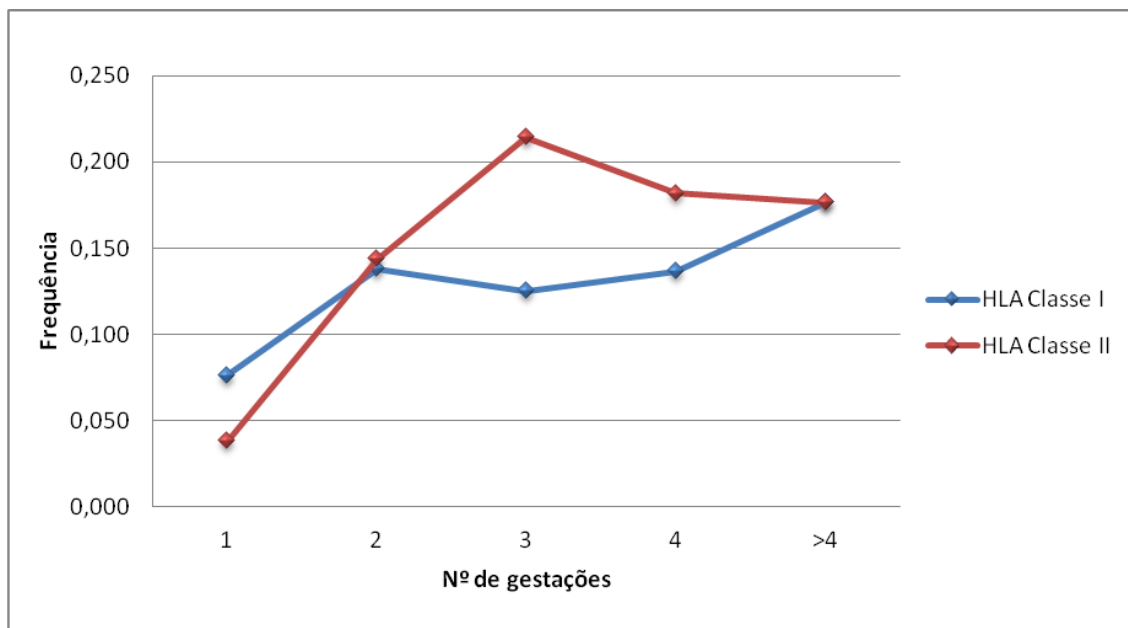


Figura 10 – Relação das frequências de imunizações anti-HLA classe I e classe II com o nº de gestações

Interpretação:

Podemos verificar que apenas nos casos em que houve apenas uma gestação, a frequência de anticorpos anti-HLA Classe I foi superior. Em todos os outros casos houve uma maior frequência de anticorpos anti-HLA Classe II. O aumento é mais significativo depois das duas gestações para os anticorpos anti- HLA Classe II sendo que a partir das 4 gestações a frequência dos anticorpos anti-HLA Classe I e Classe II são a mesma.

Frequência dos Anticorpos anti-HLA Classe I e Classe II de acordo com os resultados das gestações (Apenas aborto, Apenas nascimentos, Abortos e Nascimentos)

	HLA I	HLA II	HLA I ou II
Apenas Aborto	0	0	0
Frequência	0	0	0
Apenas Nascimentos	33	38	61
Frequência	0,116	0,134	0,215
Abortos e Nascimentos	14	11	23
Frequência	0,139	0,109	0,228

Tabela 3 – Relacionamento dos anticorpos com os resultados das gestações.

Resultado da Gestação:	Total
Nº de mulheres que só abortaram	15
Nº de mulheres que só deram à luz	284
Nº de mulheres que deram à luz e abortaram	101

Tabela 4 – Disposição do resultado da gestação de todas as mulheres dadoras do CRSL utilizadas no estudo.

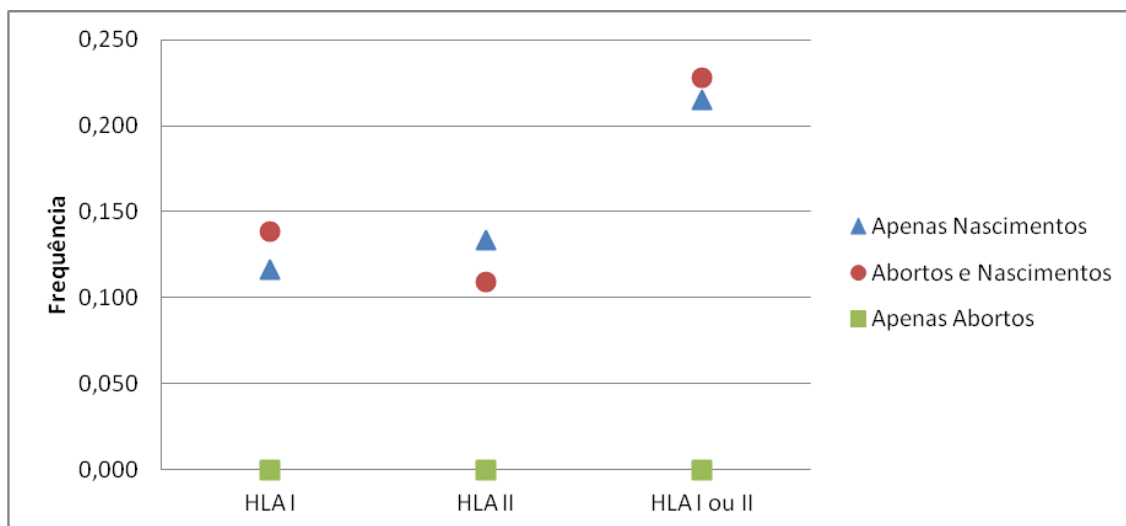


Figura 11 – Frequência da existência de anticorpos anti-HLA classe I e II em relação ao resultado da Gestação

Interpretação:

Podemos verificar que das 15 mulheres que apenas tiveram abortos, nenhuma teve resultados de anticorpos anti-HLA positivos em qualquer uma das classes. (O nº de casos em que apenas abortaram é baixo, por isso as conclusões retiradas a partir deste caso podem ser pouco conclusivas) A frequência dos casos de anticorpos anti-HLA classe I ou classe II positivos estão muito semelhante para os estados de apenas nascimentos e nascimentos e aborto.

2.2 - Comparação da Frequência entre os grupos com 1 ou 2 gestações e com 3 ou 4 gestações:

Nº de Casos	Total
Casos positivos HLA classe I com 1 ou 2 gestações	34
Casos positivos HLA classe I com 3 ou 4 gestações	10
Casos positivos HLA classe II com 1 ou 2 gestações	30
Casos positivos HLA classe II com 3 ou 4 gestações	16

Tabela 5 – Total de anticorpos anti-HLA positivos entre grupos de 1 ou 2 gestações e entre 3 ou 4 gestações.

Na nossa amostra existem 305 casos com 1 ou 2 gestações e 78 casos com 3 ou 4 gestações, sendo que os restantes (17) são casos com mais de 4 gestações.

A Frequência para anticorpos anti-HLA classe I com 1 ou 2 gestações é calculada dividindo o nº de casos positivos de anticorpos anti-HLA classe I com 1 ou 2 gestações pelo total de casos com 1 ou 2 gestações. O mesmo acontece para anticorpos anti- HLA classe II. Para os casos com 3 ou 4 gestações, o procedimento é semelhante.

Frequências	Total
Frequência HLA classe I (1G ou 2G)	0,111
Frequência HLA classe I (3G ou 4G)	0,128
Frequência HLA classe II (1G ou 2G)	0,098
Frequência HLA classe II (3G ou 4G)	0,205

Tabela 6 – Frequências dos anticorpos anti-HLA classe I e II entre os grupos de 1G ou 2 G e 3G ou 4G.

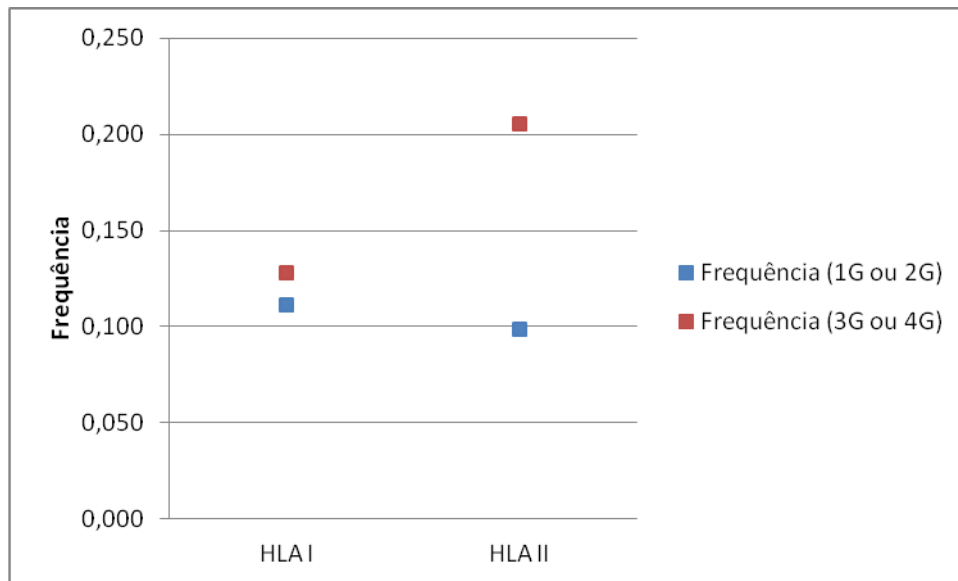


Figura 12 – Representação Gráfica das Frequências dos anticorpos anti-HLA classe I e II pelos grupos 1G ou 2G e 3G ou 4G.

Interpretação:

Podemos verificar que para anticorpos anti-HLA classe I, a frequência é superior para os casos com 3 ou 4 gestações mas são valores muito próximos.

Para anticorpos anti-HLA classe II existe uma grande diferença (de 10%), sendo que a frequência em casos com 3 ou 4 gestações é bastante superior aos casos com 1 ou 2 gestações. Como já se tinha concluído anteriormente com o nº de gestações em separado sendo mais evidente com o agrupamento das gestações em 1G ou 2G e 3G ou 4G.

V. DISCUSSÃO



No nosso estudo analisámos a frequência de anticorpos anti-HLA classe I e II a um grupo de dadores do sexo feminino com história de gravidez onde se concluiu que cerca de 21 % das dadoras estavam aloimunizadas. No caso do estudo apresentado sobre os dadores de sangue da Holanda foram identificados cerca de 27 % em anticorpos anti-HLA classe I e II positivos.¹⁰ E como tinha referido anteriormente existe outro estudo que refere cerca de 24%⁵. Temos assim resultados estão muito semelhantes.

Sabendo que os anticorpos anti-HLA estão implicados nos casos de TRALI como posso relatar dos estudos existentes. Segundo a Associação Americana de Bancos de Sangue, foram efectuadas as pesquisas de anticorpos anti-HLA aos dadores e aos receptores de componentes sanguíneos e verificou-se que em cerca de 70 % dos casos de TRALI foram identificados anticorpos anti-HLA. Em cerca de 85% a 90% dos casos o anticorpo foi identificado nos componentes sanguíneos transfundidos.^{12,13,14} Alternativamente, as medidas de adiamento com base nos testes a dadores do sexo feminino para anticorpos anti-HLA classe I e II, pode ser uma hipótese a considerar.

A maioria dos casos de TRALI é devido a componentes sanguíneos transfundidos, obtidos de mulheres múltiparas. A formação de anticorpos nas múltiparas é resultado da exposição durante a gravidez a antígenos leucocitários paternos. A probabilidade de desenvolver anticorpos anti-HLA aumenta com o número de gestações¹². Podemos ainda verificar, pelo nosso estudo, que a partir da segunda gestação é mais evidente o nº de aloimunizações e ainda que os anticorpos anti-HLA de classe II são mais frequentes do que a HLA classe I.

Em 2003, no Reino Unido foram tomadas algumas medidas no sentido de reduzir os casos de TRALI passando a utilizar plasma fresco congelado só de indivíduos do sexo masculino e também a utilização deste plasma para a suspensão de plaquetas¹⁵⁻¹⁷.

Em 2005, no Hemocentro da Universidade Federal de São Paulo, foram analisados plasmas de dadoras através de testes imunoenzimáticos para a pesquisa de anticorpos anti-HLA classe I e II dos quais cerca de 24% estavam imunizadas².

Em 2006, a AABB define orientações adicionais no sentido de redução dos casos de TRALI. Estas recomendações para os bancos de sangue estabelecem passos para minimizar o volume de plasma utilizado na preparação de componentes sanguíneos

a partir de dadores imunizados para HLA ou com elevado risco de aloimunização HLA^{14,18}.

Hoje em dia a maioria dos casos de TRALI envolve o uso de sangue total, plasma fresco congelado, concentrado de eritrócitos e concentrado de plaquetas por aférese. Além disso, os doentes que receberam uma transfusão de um dador que contém anticorpos anti-HLA positivos são mais propensos a desenvolver TRALI do que se a transfusão for de um dador de pesquisa de anticorpos anti-HLA negativos⁹.

As especificidades de anticorpos encontrados com maior frequência em casos relatados de TRALI são HLA-A2, HLA-DR4 e HLA-DR52⁹. Todos estes antígenos são relativamente comuns na população do Reino Unido, mas a frequência do antígeno não parece ser o único factor a influenciar se, o correspondente anticorpo é implicado em TRALI. A frequência do antígeno HLA-A2 é de cerca de 50% no Reino Unido enquanto na população de dadores de aférese do CRSL é de 46% e o anticorpo anti HLA-A2 foi identificado em 14% dos casos SHOT no Reino Unido. HLA-A1, no entanto, também é relativamente comum com uma frequência de antígeno de 30%, mas não existe nenhum único caso de anticorpos HLA-A1 concordantes que fosse identificado. A diferença pode ser explicada pelo facto do HLA-A2 ser mais comum em todos os grupos populacionais enquanto a frequência de HLA-A1 varia significativamente entre as diferentes grupos populacionais⁹. Na população de dadores do CRSL, da realização das tipagens HLA a todas os dadores de Aférese, calculou-se a frequência de HLA-A1 que corresponde a 17% valor diferente do apresentado anteriormente.

Brown &Navarrete apresentam, no laboratório de investigação do TRALI, um protocolo das suspeitas de situações de TRALI que passa por pesquisa de anticorpos anti-HLA e anti-HNA a dadores envolvidos no caso bem como o crossmatch serológico entre o soro do dador e granulócitos e/ou linfócitos do paciente como forma de confirmar o diagnóstico.⁹

No CRSL, este protocolo ainda não existe mas acho que poderia ser uma mais-valia para os estudos de todos os casos de possível TRALI ou TRALI.

Em relação ao tratamento estatístico, pensamos experimentar o teste de independência do Qui-Quadrado pois tínhamos como objectivo verificar se existia dependência entre a aloimunização anti-HLA classe I e classe II com o número de gestações e com o nº de

partos. Fizemos essa análise que se encontra em anexo porque os resultados obtidos não foram os esperados. Esperava que a aloimunização anti-HLA classe I e II fosse dependente do número de gestações e do número de partos para ambas as classes. A dependência só foi evidente na aloimunização anti-HLA classe II.

Dos artigos que consultei para realizar este trabalho não encontrei nenhum teste de independência que pudesse utilizar directamente daí o meu interesse em experimentar este. Para futuro, sugiro o ensaio com outra análise estatística para ver se efectivamente podemos chegar à conclusão pretendida.

1 - A IMPORTÂNCIA DA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-HLA CLASSE I CLASSE II NO SERVIÇO DE IMUNOHEMOTERAPIA:

A realização da pesquisa de anticorpos anti-HLA classe I e II a todos os dadores de sangue aloexpostos leva ao adiamento da dádiva, têm a vantagem adicional de uma retirada total de todos os anticorpos anti-HLA do fornecimento de sangue. Mas o custo financeiro de tais medidas deve ser cuidadosamente ponderados contra os benefícios práticos e do potencial risco associado com os anticorpos remanescentes após adiamento de todos os dadores aloexpostos. Apesar do adiamento à dádiva de todos os dadores allo-expostos remover uma parte dos anticorpos leucocitários do sangue, a prevalência seria reduzido em apenas um quinto, porque o pool de plaquetas de dadores também seria reduzido. No entanto, excluindo todos os dadores do sexo feminino resultaria num aumento dos dadores excluídos, não parece ser uma medida muito plausível levando em conta as necessidades dos bancos de sangue no fornecimento aos hospitais de componentes sanguíneos.

Recentes estudos realizados na América do Norte ^{19, 20} onde a composição étnica das populações de dadores é muito diferente da situação da Europa Ocidental demonstra que o fundo étnico está associado com diferentes frequências de HLA, isso pode também influenciar a prevalência de anticorpos anti-HLA. No entanto, a prevalência de anticorpos anti-HLA após a gravidez foi comparável ao de dois recentes estudos norte-americanos¹² e, foi surpreendentemente maior. A prevalência observada na população de dadores da Holanda¹² foi substancialmente maior do que o estudo à população de dadores alemã¹⁹. Qualquer tentativa de explicar essa diferença deve permanecer

puramente especulativa. Pode ser explicado pela imigração na população holandesa, os imigrantes de diferentes origens ao longo dos séculos, podem ter contribuído para uma maior diversidade do conjunto de genótipos HLA tal como em outras populações. Logo aumentaria as hipóteses de uma incompatibilidade de antigénio entre uma mulher grávida e seu filho¹⁰.

A frequência de anticorpos anti-HLA classe II para o caso de dadoras com três ou mais gestações é bastante maior comparada com o caso de dadoras com uma ou duas gestações, tal como é possível verificar também noutros estudos¹⁰.

Em relação ao tempo entre gestações e ao aumento ou diminuição da presença de anticorpos anti-HLA não me foi possível observar por falta de dados. Da realização desta pesquisa de anticorpos anti-HLA classe I e II às dadoras de componentes sanguíneos por aférese no CRSL pudemos observar que existem dadoras com 3 ou mais gestações cujo resultado desta pesquisa de anticorpos é negativa mas também pudemos observar casos de dadoras com duas gestações e a pesquisa de anticorpos anti-HLA ser positiva. Este facto pode ser explicado pela presença de anticorpos após aloexposição diferir de pessoa para pessoa. Também podemos dizer que com o passar do tempo existe efectivamente uma queda natural da prevalência destes anticorpos¹⁰. No caso das gravidezes que levaram a aborto, verificou-se no estudo de dadores da Holanda que o reduzido tempo de exposição não levou à imunização induzida por anticorpos anti-HLA¹⁰. No nosso estudo pudemos observar isso mesmo, só o caso de nascimentos com abortos levou a uma elevada exposição e consequentemente a uma imunização induzida por anticorpos anti-HLA. Logo, tal como em estudos anteriores^{10,19,20}, a redução do risco de imunização não foi observada nos casos de partos com vida e gestações que levaram a aborto. O tipo de resultado da gravidez pode influenciar tanto o grau de exposição da mãe para o HLA paterno e influenciar a probabilidade de desenvolvimento de anticorpos. A preocupação de, em triagem clínica, recolher a informação sobre a história de gravidez pode não ter a necessária precisão mas pode ajudar na selecção para pesquisa de anticorpos anti-HLA.

	Alemanha	Reino Unido	CRSL IPS,IP
Dadores aloimunizados	9%	24%	21%
HLA classe I	61%	29%	11,75%
HLA classe II	19%	38%	12,25%
HLA classe I e II	12%	33%	3%

Tabela 7: Comparação da Frequência de anticorpos anti-HLA positivos nos dadores do sexo feminino multiparas da Alemanha com o Reino Unido²⁰ em conjunto com o nosso estudo.

2 - HEMOVIGILÂNCIA:

A hemovigilância é um sistema que permite a detecção, registo e análise da informação relativa a efeitos adversos e inesperados na transfusão sanguínea. A maioria dos países europeus tem um sistema de hemovigilância em função da directiva europeia 2005/61/EC².

A rede de hemovigilância mais importante na União Europeia é a rede britânica SHOT (*Serious Hazards of Transfusion*). Em relação ao efeito adverso à Transfusão o que parece preocupante são os dados acumulados de 1996 a 2007 (n=4334) mostra que 5,1% (n=219) são casos de TRALI. No ano de 2007 registaram-se 561 casos de efeitos adversos nos quais cerca de 4,3% correspondem a TRALI. Cinco destes originados pela transfusão de eritrócitos, outros cinco com transfusão de plaquetas, um por outro tipo de produtos e em 13 casos não se podemos determinar a origem².

Os casos de TRALI registados em Portugal pela Rede de Hemovigilância podem ser visíveis pela seguinte tabela:

Ano	2007	2008 ²¹	2009	2010
Nº de casos de TRALI	04	02	03	01

Tabela 8: Casos de Lesão Pulmonar Aguda produzida por Transfusão (TRALI) publicados pelo Sistema Nacional de Hemovigilância.

O que podemos verificar pela tabela em baixo que Portugal está muito aquém dos outros países porque muitas das reacções de possível TRALI são confundidas com outras reacções transfusionais e não se analisa a fundo se é ou não esta reacção transfusional (com estudos laboratoriais ao dador e receptor). Os casos reportados na tabela abaixo são referentes ao ano de 1996 a 2005, houve medidas implementadas para redução dos casos de TRALI desde 2006 logo esta tabela não reporta os valores actuais.

Países	Reino Unido	Alemanha	Dinamarca	França	Canadá (Québec)	Noruega	Finlandia	Suécia
Período	1996-2003	1195-2002	1999-2003	1994-1998	2000-2003	2004-2005	2004-2005	2004
Casos de TRALI	139	101	9	34	21	2	10	11

Tabela 9: Casos de Lesão Pulmonar Aguda produzida por Transusão (TRALI)² publicados pelas Redes de Hemovigilância.

	German haemovigilance system [16]	SHOT (UK) [15]
<i>n</i>	28	73
HLA class I	4%	23%
HLA class II	47%	34%
HLA class I & class II	21%	18%
HNA	28%	8%
Unspecified		17%

SHOT, Serious Hazards of Transfusion.

Tabela 10: Casos de TRALI com presença de anticorpos anti-HLA²¹.

Esta tabela compara a frequência de anticorpos anti-HLA e anti-HNA responsável pelos casos de TRALI do Sistema de Hemogilância da Alemanha com o SHOT da Rede Britânica. Como se pode visualizar trata se de resultados completamente diferentes em que no caso da Alemanha temos maior frequência nos anticorpos anti-HLA classe II com 47% e anti-HNA com cerca de 28% e no Caso Britânico temos os anticorpos anti-HLA de classe II e os de classe I com um maior número.

3. PREVENÇÃO:

O uso de componentes sanguíneos desleucocitados tem reduzido o número de reacções imunes (TRALI) por causa dos anticorpos de leucócitos no receptor. Porque, no dador, os anticorpos dos componentes sanguíneos implicados no TRALI são geralmente de dádivas de mulheres múltíparas, *Thompson et al* levantou esta preocupação em 1971²¹.

No Reino Unido depois de implementadas as medidas de prevenção houve uma redução do risco de TRALI. O número de morte por TRALI assinalados diminuiu de 9 em 2003 para 1 em 2006. Na Alemanha, o uso de PFC de dadores do sexo masculino e nulíparas ou múltíparas, mas com pesquisa de anticorpos anti-HLA negativos a dadores do sexo feminino tornou-se obrigatório a partir de Setembro de 2009. O número de casos TRALI diminuiu de 19 em 2008 para 12 em 2009 e o número de fatalidades de 5 para 1 (comunicação pessoal do Paul-Ehrlich Institute). A Cruz Vermelha Americana iniciou em 2006 a distribuição de PFC preferencialmente a partir dadores do sexo masculino. O número de mortes por causa do PFC diminuiu de seis em 2006 para zero em 2008.

Todos estes dados indicam que estas medidas são bem sucedidas na redução do número de anticorpos anti-HLA que eram mediadores de TRALI. Para evitar a escassez de Plaquetas por Aferese (CUP) e PFC do grupo sanguíneo AB, o rastreio de dadores do sexo feminino múltíparas por aférese para anticorpos anti-HLA pode reduzir o seu adiamento. Os dadores têm de ser testados apenas uma vez e mais tarde um novo teste somente após re-exposição a aloantígenos anti-HLA.

Estas medidas preventivas têm sido aplicadas noutros centros de sangue e serviços de outros países com elevados benefícios como já foi descrito. Foram realizados com o objectivo de melhorar a qualidade dos componentes sanguíneos e trazer maior benefício para o doente. A adopção destas medidas para o CRSL seria uma mais-valia aliando Qualidade/Benefícios.

VI. CONCLUSÃO



Em conclusão, 21% da população de dadores do sexo feminino do Centro Regional de Sangue de Lisboa, voluntários apresentam a pesquisa de anticorpos anti-HLA positivos. Consequentemente, o adiamento de todas as dadoras alo-expostas (ou seja, 21% de todos os dadores) irá remover parte dos anticorpos anti-HLA a partir do fornecimento de sangue, reduzindo a frequência destes.

A sua influência na redução da prevalência da TRALI podia ter influência se todos os casos de TRALI fossem identificados e notificados. A colocação da pesquisa de anticorpos anti-HLA classe I e II em rotina poderia trazer uma maior segurança nos produtos sanguíneos a transfundir mas poderia reduzir o número de stock em produtos sanguíneos nas reservas dos bancos de sangue.

Tendo em conta o excelente resultado das medidas adoptadas pelo serviço de sangue inglês SHOT, Cruz Vermelha Americana¹⁵ e Cruz Vermelha Alemã²⁰ podemos sugerir a implementação de uma série de medidas para reduzir a frequência de TRALI bem como o melhor conhecimento por parte dos serviços de medicina transfusional.

As medidas a implementar em torno da redução do uso de dadores do sexo feminino para a obtenção de componentes sanguíneos que contém um volume significativo de PFC, passavam por:

- A produção de PFC de dadas de dadores do sexo masculino.
- A preferência de dadores do sexo masculino para aférese.
- Pesquisa de anticorpos anti-HLA de todas as dadoras de primeira vez de aférese e sempre que referissem aloexposição. Medida já adoptada pelo CRSL.

Com a adopção destas medidas podemos referir que no caso da população Holandesa reduziram em cerca de 33% os casos de TRALI¹⁰.

Todos os estudos aos ensaios imunológicos para detecção de anticorpos anti-HLA classe I e classe II tem sido desenvolvidos para a área do transplante mas também podem ser utilizados na área dos dadores de sangue como forma de redução do TRALI.

Como medida preventiva de TRALI imunológico a estratégia de usar plasma de dadores do sexo masculino ou de dadores do sexo feminino sem história de gravidez ou

a implementação da pesquisa de anticorpos anti-HLA classe I e II podem ter efeitos positivos na redução de casos graves e fatais. Para o caso de TRALI não-imune a selecção de componentes sanguíneos frescos (de colheitas recentes) para a transfusão de doentes politransfundidos pode ser uma medida a adoptar.

A implementação de acções de formação para dar a conhecer melhor esta reacção transfusional e em caso de dúvida não ter medo de avançar para pesquisa em laboratório, bem como a notificação para o Sistema Nacional de Hemovigilância parece ser um bom começo para a redução da TRALI.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-Endres RO, Kleinman SH, Carrick DM, Steele WR, Wright DJ, Norris PJ, Triulzi DJ, Kakaiya RM, Busch MP. Identification of specificities of antibodies against human leukocyte antigens in blood donors. *Transfusion* 2010 August; 50:1749-1760.
- 2- Añon JM, Lorenzo AG, Quintana M, González E, Bruscas MJ. Lesión pulmonar aguda produzida por transfusión. *Medicina intensiva* 2010; 34: 139-149.
- 3-Choo SY. The HLA System and Transfusion Medicine. *Transfusion Medicine* 2^a Edition, Jeffrey Mc Cullough, MD; 2005;16:441-448.
- 4-Rosa FA, Cardoso E, Pacheco F. Fundamentos de Imunologia. Edições Técnicas Lidel; 2007;4:63-78.
- 5- Junior AF, Lopes LB, Bordin JO. Lesão pulmonar aguda associada à transfusão. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2007; 33: 206-212.
- 6- Bux J. Transfusion-related acute lung injury (TRALI): a serious adverse event of blood transfusion. *Vox Sanguinis* 2005; 89: 1-10.
- 7 - Bux J.:Antibody mediated (immune) transfusion-related acute lung injury. *Vox Sanguinis* 2011; 100:122-128.
- 8 – Khan H, Cartin-Ceba R, Gajic O, Transfusion and Acute Lung Injury in the Critically Ill. In Kleinman S, Popovsky MA, eds. *TRALI: Mechanisms, Management, and Prevention*. Bethesda, MD: AABBpress; 2008; 2:13-39.
- 9 - Brown CJ, Navarrete CV. Clinical relevance of the HLA system in blood transfusion. *Vox Sanguinis* 2011 Aug;101(2):93-105.
- 10- Kopko P. H.HLA Antibody Testing. In Kleinman S, Popovsky MA, eds. *TRALI: Mechanisms, Management, and Prevention*. Bethesda, MD: AABBpress; 2008;5:101-117
- 11-Trindade H. Imunologia da Alossensibilização Anti-HLA. *ABO Revista de Medicina Transfusional* 2009;39:37-50.
- 12- Middelburg RA, Porcelijn L, Lardy N, Briët E, Vrielink H. Prevalence of leucocyte antibodies in the Dutch donor population. *VOX Sanguinis* 2011; Apr;100(3):327-35.
- 13 - Kakaiya RM, Triulzi DJ, Wright DJ, Steele WR, Kleiman SH, Busch MP, Norris PJ, Hillyer CD, Gottschall JL, Rios JA, Carey P, Glynn SA. Prevalence of HLA antibodies in remotely transfused or alloexposed volunteer blood donors. *Transfusion* 2010 June;50: 1328-1334
- 14- Lee JH, Kang ES, Kim DW. Two Cases of transfusion-related acute lung injury Triggered by HLA and Anti-HLA Antibody Reaction. *Journal of Korean Medical Science* 2010 September; 25: 1398-1403
- 15– Eder AF, Herron Jr RM, Strupp A, Dy B, White J, Notari EP, Dodd RY, Benjamin RJ. Effective reduction of transfusion-related acute lung injury with male-predominant plasma strategy in the American Red Cross (2006-2008). *Transfusion* 2010 August; 50:1732-1742.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 16 - Murphy MF, Navarrete C, Massey E. Donor screening as a TRALI risk reduction strategy. *Transfusion* 2009 September; 49: 1779-1782.
- 17 - Triulzi DJ, Kleinman S, Kakaiya RM, Busch MP, Norris PJ, Steele WR, Glynn SA, Hillyer CD, Carey P, Gottschall JL, Murphy E L, Rios JA, Ness PM, Wright DJ, Carrick D, Schreiber GB. The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA alloimmunization in blood donors: implications for a transfusion-related acute lung injury risk reduction strategy. *Transfusion* 2009 September; 49: 1825-1835.
- 18 - Densmore TL, Goodnough LT, Ali S, et al. Prevalence of HLA sensitization in female apheresis donors. *Transfusion* 1999; 39(1):103–106
- 19 - Reil A, Keller-Stanislawski B, Gunay S, et al.: Specificities of leucocyte alloantibodies in transfusion-related acute lung injury and results of leucocyte antibody screening of blood donors. *Vox Sang* 2008; 95(4):313–317.
- 20 - Powers A, Stowell CP, Dzik WH, et al.: Testing only donors with a prior history of pregnancy or transfusion is a logical and cost-effective transfusion-related acute lung injury prevention strategy. *Transfusion* 2008; 48:2549–58.
- 21- Escoval MA, CondeçoJ: Hemovigilância em Portugal situação e resultados do ano de 2008. *ABO Revista de Medicina Transfusional* 2009;39:11-16.
- 22 - Reis E, Melo P, Andrade R, Calapez T, *Estatística Aplicada*; Edições Sílabo, 2007; 1:238-245.

VI. ANEXO I

Utilização do teste de independência do Qui-Quadrado:

Para verificar se existe relação entre a aloimunização anti-HLA classe I e II e o número de gestações e o número de partos, utilizámos o teste de independência do Qui-Quadrado.

Este teste “mede” a diferença entre o número de casos observados e o número de casos esperados (em cada célula). Se esta diferença for significativa, as variáveis são dependentes, caso contrário, as variáveis não dependem uma da outra.

O valor esperado (e_{ij}) de cada célula é dado por $e_{ij} = \frac{O_{i.} \times O_{.j}}{n}$, em que $O_{i.}$ é o total observado da linha i e $O_{.j}$ é o total observado da coluna j .

A estatística de teste (que mede a diferença global entre valores observados e esperados) segue uma distribuição Qui-Quadrado com $(r-1)(c-1)$ graus de liberdade e é dada por:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}} \cap \chi^2_{(r-1)(c-1)}$$

Pressupostos do teste do Qui-Quadrado :

- nenhuma célula da tabela tenha frequência esperada inferior a 1;
- não mais do que 20% das células tenham frequência esperada inferior a 5 unidades.

Quando estamos perante uma situação em que os pressupostos são violados, poderemos fazer a fusão entre dois “níveis” para que o teste possa ser aplicado.

Para os “Gest”: O que fizemos foi juntar os indivíduos com 4 ou mais partos num único “nível”, de forma a cumprir os pressupostos.

Para os “Para: O que fizemos foi juntar os indivíduos com 3 ou mais partos num único “nível”, de forma a cumprir os pressupostos.

Aplicamos directamente nas tabelas dos testes do Qui-Quadrado o recurso aos resíduos ajustados standardizados. Quanto maior em valor absoluto for um resíduo, maior é a diferença entre as frequências observadas e esperadas, e portanto mais significativa é a associação entre duas variáveis.

Quando estes resíduos se situam entre -1.96 e 1.96, o comportamento dessa célula é semelhante ao esperado, à média, e não há nada de novo a relatar.

Quando estes resíduos se situam abaixo de -1.96, significa que essa célula tem um comportamento significativamente inferior ao esperado, ou inferior à média.

Quando estes resíduos se situam acima de 1.96, significa que essa célula tem um comportamento significativamente superior ao esperado, ou superior à média.

Assim, quando há relação entre as variáveis, os resíduos ajustados estandardizados situam-se fora do intervalo -1.96 a 1.96.

Podemos então ver quais as células que são as fontes de dependência entre as variáveis.

Hipóteses:

1. As hipóteses a testar são:

H_0 : A aloimunização (para anticorpos anti-HLA classe I) é independente do número de gestações

H_A : A aloimunização (para anticorpos anti-HLA classe I) depende do número de gestações

Gest * HLA I Crosstabulation

			HLA I		Total
			N	P	
Gest	1	Count	121	10	131
		Expected Count	115,6	15,4	131,0
		Adjusted Residual	1,8	-1,8	
	2	Count	150	24	174
		Expected Count	153,6	20,4	174,0
		Adjusted Residual	-1,1	1,1	
	3	Count	49	7	56
		Expected Count	49,4	6,6	56,0
		Adjusted Residual	-,2	,2	
	>3	Count	33	6	39
		Expected Count	34,4	4,6	39,0
		Adjusted Residual	-,7	,7	
Total	Count	353	47	400	
	Expected Count	353,0	47,0	400,0	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	3,368 ^a	3	,338
Likelihood Ratio	3,563	3	,313
N of Valid Cases	400		

a. 1 cells (12,5%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,58.

Resultados obtidos pelo teste do Qui-Quadrado da relação do número de gestações com a aloimunização anti-HLA classe I

Interpretação:

Pela última tabela, verificamos que o valor da estatística de teste é de 3,368. Quanto aos resíduos, podemos verificar que estão todos no intervalo -1.96 a 1.96, tendo comportamentos semelhantes aos esperados.

A interpretação pode ser feita de duas formas:

- 1) Utilizando o valor da estatística de teste e comparando-o com o valor tabelado (tabela do Qui-Quadrado) com 7 graus de liberdade;
- 2) Utilizando o valor P (ou *p-value*) que é dado pela tabela na coluna Asymp. Sig. (2-sided);

Para simplificar, utilizaremos o segundo processo.

O primeiro passo é escolher o nível de significância (α) que pretendemos, isto é, a probabilidade máxima de rejeitar acidentalmente uma hipótese nula verdadeira. Habitualmente os níveis de significância escolhidos são de 1%, 5% e 10%, sendo o de 5% o mais usual.

Rejeita-se a hipótese nula, no nosso caso “A aloimunização é independente do número de gestações”, se o valor p for inferior ao nível de significância ($\alpha=0.05$). Caso contrário, não se rejeita a hipótese nula.

Como o valor $p = 0.338$ que é maior do que $\alpha=0.05$, não se rejeita H_0 , isto é, a aloimunização (para anticorpos anti-HLA classe I) é independente do número de gestações.

2- As hipóteses a testar são:

H_0 : A aloimunização (para anticorpos anti-HLA classe II) é independente do número de gestações

H_A : A aloimunização (para anticorpos anti-HLA classe II) depende do número de gestações

Gest * HLA II Crosstabulation

			HLA II		Total
			N	P	
Gest	1	Count	126	5	131
		Expected Count	115,0	16,0	131,0
		Adjusted Residual	3,6	-3,6	
	2	Count	149	25	174
		Expected Count	152,7	21,3	174,0
		Adjusted Residual	-1,1	1,1	
	3	Count	44	12	56
		Expected Count	49,1	6,9	56,0
		Adjusted Residual	-2,3	2,3	
	>3	Count	32	7	39
		Expected Count	34,2	4,8	39,0
		Adjusted Residual	-1,1	1,1	
Total	Count		351	49	400
		Expected Count	351,0	49,0	400,0

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	14,960 ^a	3	,002
Likelihood Ratio	16,905	3	,001
N of Valid Cases	400		

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	14,960 ^a	3	,002
Likelihood Ratio	16,905	3	,001
N of Valid Cases	400		

a. 1 cells (12,5%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,78.

Resultados obtidos pelo teste do Qui-Quadrado da relação do número de gestações com a aloimunização anti-HLA classe II.

Resultados:

Como o valor $p = 0.002$ que é menor do que $\alpha = 0.05$, rejeita-se a hipótese nula, isto é, a aloimunização (para anticorpos anti-HLA classe II) depende do número de gestações.

Quanto aos resíduos, podemos verificar que para 1 gestação e para 3 gestações, os valores observados estão bastante distantes dos valores esperados, sendo portanto essas quatro células as principais fontes de dependência entre as duas variáveis.

3- As hipóteses a testar são:

H_0 : A aloimunização (para HLA I) é independente do número de partos

H_A : A aloimunização (para HLA I) depende do número de partos

Para * HLA I Crosstabulation

			HLA I		Total
			N	P	
Para 0	Count		15	0	15
	Expected Count		13,2	1,8	15,0
	Adjusted Residual		1,4	-1,4	
1	Count		141	14	155
	Expected Count		136,8	18,2	155,0
	Adjusted Residual		1,3	-1,3	
2	Count		159	24	183
	Expected Count		161,5	21,5	183,0

3	Adjusted Residual	-,8	,8	
	Count	38	9	47
	Expected Count	41,5	5,5	47,0
Total	Adjusted Residual	-1,7	1,7	
	Count	353	47	400
	Expected Count	353,0	47,0	400,0

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	5,911 ^a	3	,116
Likelihood Ratio	7,392	3	,060
N of Valid Cases	400		

a. 1 cells (12,5%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,76.

Resultados obtidos pelo teste do Qui-Quadrado da relação do número de partos com a aloimunização anti-HLA classe I

Resultados:

Como o valor $p = 0.116$ que é maior do que $\alpha=0.05$, não se rejeita a hipótese nula, isto é, a aloimunização (para anticorpos anti-HLA classe I) não depende do número de partos. Quanto aos resíduos, podemos verificar que estão todos no intervalo -1.96 a 1.96, tendo comportamentos semelhantes aos esperados.

4- As hipóteses a testar são:

H_0 : A aloimunização (para anticorpos anti-HLA classe II) é independente do número de partos

H_A : A aloimunização (para anticorpos anti-HLA classe II) depende do número de partos

Para * HLA II Crosstabulation

			HLA II		Total
			N	P	
Para 0	Count		15	0	15
	Expected Count		13,2	1,8	15,0
	Adjusted Residual		1,5	-1,5	
1	Count		147	8	155
	Expected Count		136,0	19,0	155,0
	Adjusted Residual		3,4	-3,4	
2	Count		157	26	183
	Expected Count		160,6	22,4	183,0
	Adjusted Residual		-1,1	1,1	
>2	Count		32	15	47
	Expected Count		41,2	5,8	47,0
	Adjusted Residual		-4,4	4,4	
Total	Count		351	49	400
	Expected Count		351,0	49,0	400,0

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	26,900 ^a	3	,000
Likelihood Ratio	26,043	3	,000
N of Valid Cases	400		

a. 1 cells (12,5%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,84.

Resultados obtidos pelo teste do Qui-Quadrado da relação do número de partos com a aloimunização anti-HLA classe II

Resultados:

Como o valor $p = 0.000$ que é menor do que $\alpha = 0.05$, rejeita-se a hipótese nula, isto é, a aloimunização (para anticorpos anti-HLA classe II) depende do número de partos.

Quanto aos resíduos, podemos verificar que para 1 parto e mais do que 2 partos, os valores observados estão bastante distantes dos valores esperados, sendo portanto essas quatro células as principais fontes de dependência entre as duas variáveis.

Conclusão:

Podemos então verificar que a aloimunização para HLA classe I não depende do número de gestações nem do número de partos. Por outro lado, a aloimunização para HLA classe II depende do número de gestações e também do número de partos.

Não sendo este o resultado esperado espera-se que no futuro trabalho se possa procurar um outro teste que possa dar a conclusão esperado: a aloimunização para HLA classe I e II está dependente do número de partos e do nº de gestações.